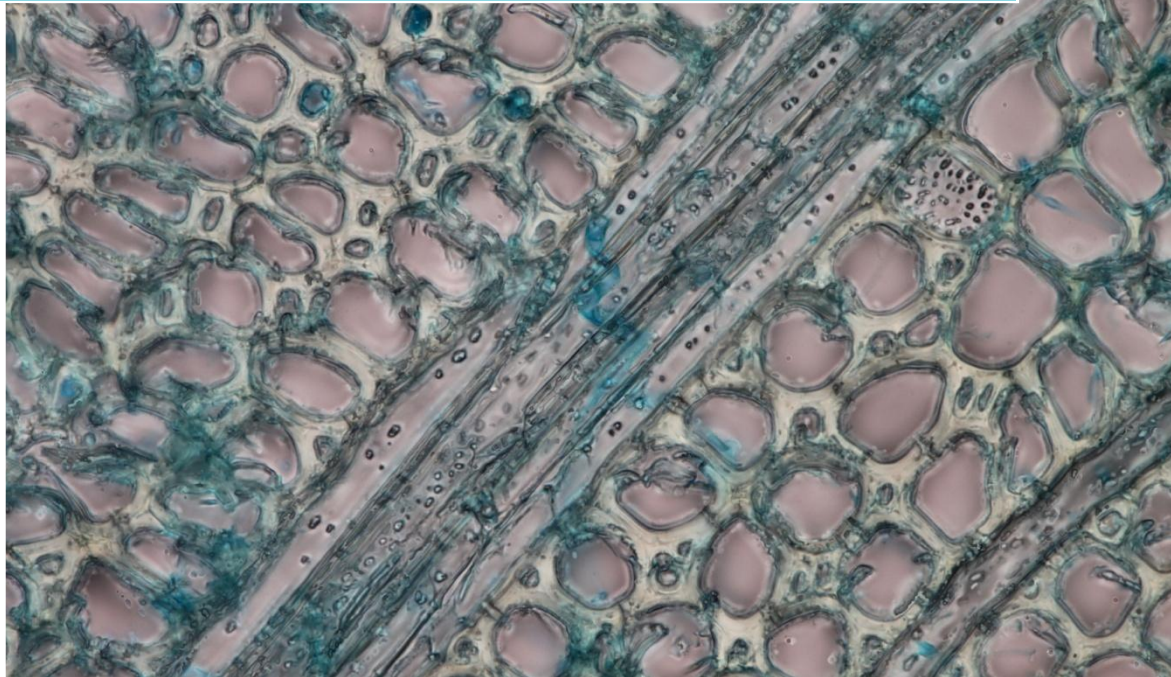


Mémoire de stage de

Clara Zaremski

**Master 2
Biodiversité
Végétale Tropicale**

Etude de la qualité du sol forestier tropical de Guyane dans la biodégradation de bois traité et non traité, par les communautés fongiques endogènes de sols de Guyane.



Encadrement

Docteur Alba ZAREMSKI

CIRAD AGAP-GFP - Amélioration des Espèces Forestières, TA A - 108/C, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Docteur Jacques BEAUCHENE

Laboratoire des Sciences du Bois ; BP 701 ; 97387 Kourou Cedex ; Guyane Française, France.

Déroulement du stage

Du 21 Janvier 2013 au 28 Juin 2013

Au Laboratoire des Sciences du Bois
de l'UMR ECOFOG, BP 701 ; 97387

Kourou Cedex ; Guyane Française

Université Montpellier II – Master Biodiversité Végétale Tropicale

Mémoire de Master II

Clara Zaremski

Etude de la qualité du sol forestier tropical de Guyane dans la biodégradation de bois traité et non traité, par les communautés fongiques endogènes de sols de Guyane.

ENCADREMENT

Docteur Alba ZAREMSKI

CIRAD AGAP-GFP -Amélioration des Espèces Forestières, TA A - 108/C, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Docteur Jacques BEAUCHENE

Laboratoire des Sciences du Bois ; BP 701 ; 97387 Kourou Cedex ; Guyane Française, France.

DEROULEMENT DU STAGE

Du 21 Janvier 2013 au 28 Juin 2013

Au Laboratoire des Sciences du Bois de l'UMR ECOFOG, BP 701 ; 97387 Kourou Cedex ; Guyane Française

LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius.

% : Pourcent.

© : Copyright.

® : Marque déposée.

χ^2 : Chi élevé au carré.

AgroParisTech : Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

CEBA : Centre d'Etude de la Biodiversité Amazonienne.

CCA : Arséniate de Cuivre Chromaté.

CEMRS : Centre d'Excellence de Montréal en Réhabilitation de Site.

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

cm : centimètre(s).

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique.

df : degree of freedom.

DNA : DeoxyriboNucleic Acid.

et al. : *et alii*.

ECOFOG : ECOlogie des Forêts de Guyane.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

LabEx : Laboratoire d'Excellence.

LiP : Lignine Peroxydase.

MDDEP : Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs.

m : mètre(s).

mL : milliLitre(s)

mm : millimètre(s)

MnP : Manganèse Peroxydase.

µL : MicroLitre(s)

ng : nanogramme(s)

nm : nanomètre(s)

P-value : risque de première espèce.

PCP : PentaChloroPhénol.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

SupAgro : École nationale supérieure agronomique de Montpellier.

UMR : Unité Mixte de Recherche.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau 1 : résultats des tests de Kruskal-Wallis entre les pièges pour chaque site

Tableau 2 : traduction des pertes de masse en classes de résistance.

FIGURES

Figure 1 : Schéma en deux dimensions de la molécule de Pentachlorophénol.

Figure 2 : Schémas en deux dimensions des molécules d'Oxyde de Cuivre (Cu) (a), de Trioxyde de Chrome (Cr) (b) et de Pentoxyde d'Arsenic (As) (c).

Figure 3 : Eprouvettes traitées et témoins.

Figure 4 : Cartes de la Guyane (a) et de la Réunion (b) avec les lieux d'intérêt pour l'étude.

Figure 5 : Photographie d'un conteneur après la mise en place des éprouvettes dans le sol, le 01/04/2010.

Figure 6 : Schéma des conteneurs pour les essais sur les bois traités au PCP et au CCA.

Figure 7 : Description de la PCR (a) et amorces utilisées : ITS1myc et ITS4-myc (b).

Figure 8 : Comparaison de la perte de masse entre les sites de Paracou et Kourou.

Figure 9 : Comparaison de la perte de masse pour chaque piège dans les différents sites.

Figure 10 : Comparaison des pertes de masse d'éprouvettes de Pin rouge traitées par différents traitements, CCA (a), PCP_{sol} (b) et PCP_{1m} (c), entre deux sites de deux régions géographiques différentes (Guyane et Réunion).

Figure 11 : Comparaison de la perte de masse pour les éprouvettes de Pin rouge soumises à différent traitement.

Figure 12 : Comparaison des pertes de masse d'éprouvettes de Pin rouge traitées par différents traitements, CCA (a), PCP_{sol} (b) et PCP_{1m} (c), dans leurs 3 conteneurs respectifs.

Figure 13 : Comparaison des pertes de masse pour les 3 traitements dont PCP_{1m} est divisé en 2.

Figure 14 : Comparaisons des pertes de masse des éprouvettes témoin en Pin rouge pour les traitements CCA et PCP_{sol}.

SOMMAIRE

LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS	i
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	iii
SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	v
INTRODUCTION.....	1
MATERIELS ET METHODES	5
1. <i>Matériel biologique</i>	5
2. <i>Mise en place des essais</i>	5
a. <i>Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Simarouba amara Aubl. dans différents types de sol de Guyane.....</i>	5
b. <i>Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de la Réunion.</i>	6
c. <i>Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de Guyane.</i>	6
3. <i>Mesure de la perte de masse</i>	6
4. <i>Suivi des populations fongiques</i>	7
a. <i>Réduction des éprouvettes en poudre</i>	7
b. <i>Extraction de l'ADN</i>	7
c. <i>Quantification</i>	8
d. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	8
e. <i>L'électrophorèse</i>	8
f. <i>Séquençage</i>	8
g. <i>Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST</i>	9
5. <i>Analyses statistiques</i>	9
RESULTATS.....	10
1. <i>Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Simarouba amara dans différents types de sol de Guyane.</i>	10
2. <i>Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de la Réunion.</i>	11
3. <i>Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de Guyane.</i>	11
a. <i>Perte de masse des éprouvettes traitées</i>	11
b. <i>Perte de masse des éprouvettes témoins</i>	12
c. <i>Suivi des populations fongiques.....</i>	13
DISCUSSION	14
CONCLUSION.....	17
REFERENCES	
ANNEXE 1 : PRESENTATION DU LABORATOIRE D'ACCUEIL	
ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'EXTRACTION INVITROGEN PURELINK TOTAL DNA PURIFICATION KIT, AVEC LES OPTIMISATIONS DE LECOEUR (2012) POUR L'EXTRACTION D'ADN FONGIQUE DANS LE BOIS, SOULIGNEES.	
ANNEXE 3 : COMPLEMENTS AU MATERIEL ET METHODES	

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mes encadrants de stage qui m'ont permis de travailler sur ce projet et de le mener à son terme. Tout particulièrement, je te remercie, Alba, pour ta confiance, ton aide et ton courage. Jacques, j'ai adoré travailler à tes côtés et apprendre au quotidien.

Gaëtan, je te remercie pour ton aide et tes remarques sur mes travaux. Et, évidemment, merci à Louis, sans qui cette aventure n'aurait pas pu avoir lieu.

Un grand merci aussi, à tous les membres du Laboratoire des Sciences du Bois de l'UMR ECOFOG à Kourou.

A Julie et nos rigolades entre filles et nos discussions autour d'un café! Une épaule !

A Hélène et sa disponibilité ! Grâce à toi, la rédaction de ce rapport a été un peu plus simple !

A Nadine et sa gentillesse et sa connaissance de la Guyane !

A Bruno et son aide précieuse et son intérêt pour mon sujet ! J'espère que nous travaillerons ensemble dès Septembre !

A Patrick et ses commentaires qui font toujours aller de l'avant !

A Eric et sa passion pour le terrain !

A Romain et son enthousiasme pour répondre à mes questions ! C'était une aide précieuse pour prendre le recul qui peut manquer, parfois !

A Georges et ses innombrables sujets de conversation !

A Koese et son savoir-faire incommensurable !

Bien sûr, j'aimerais remercier ceux qui ne liront probablement pas ce rapport mais qui sont ceux qui m'ont donné de près (en Guyane) ou de loin (à Montpellier) la force pour mon travail. Merci à mes parents, mon grand père, mon frère et mes amis de Montpellier. Merci de me soutenir dès que j'en ai besoin malgré 10 000 km de distance et 5h de décalage horaire ! Merci à mes colloques : JM en particulier ! Et merci à mes amis de Cayenne et de Saint Laurent, qui ont renforcé mon amour pour la Guyane. Merci à Laurent, Florent, Louise et Pierre, et Mathieu.

Et pour finir, une pensée spéciale aux étudiants de la promo 2011-2013 du Master BVT ! Nous finissons nos années de master : c'était parfait de les vivre avec vous ! Nina, merci d'avoir été avec moi en Guyane cette année, même si ce n'était que trois semaines... Tu m'as énormément apporté !

A ma mère...

INTRODUCTION

Le bois est un des matériaux de construction les plus utilisés (MDDEP, 2011) car il est facile à trouver et à transformer. En tant que matière organique, le temps le conduit vers une dégradation de sa substance, à plus forte raison lorsqu'il est exposé aux pathogènes tels que les champignons, les bactéries et les insectes. Pour tenter d'inhiber ce phénomène, plusieurs traitements de préservation ont été développés et appliqués grâce au développement de substances chimiques biocides (MDDEP, 2011). Les traitements de préservation des bois se font par différentes techniques, plus ou moins efficaces en fonction de la profondeur de pénétration du produit. Les techniques utilisées sont, notamment, l'application de surface, le trempage et différentes techniques d'imprégnation (Fougerousse, 1979). Ce sont des procédés à base de produits chimiques très toxiques, tels que les métaux lourds ou les composés aromatiques, qui permettent au matériau de passer outre les dégradations abiotiques ou celles causée par les champignons ou les insectes. En 1998, l'Union Européenne a édicté la directive biocide 98/8/CE. Elle vise à harmoniser l'évaluation scientifique et la commercialisation des produits biocides de telle sorte qu'ils ne présentent pas de risque pour la santé des hommes et des animaux et pour l'environnement. Cependant, certains de ces produits posent des problèmes non résolus de toxicité, de rémanence et de devenir en fin de vie dans les matériaux traités (Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, 2013). En effet, le bois, ainsi traité, ne peut ni être brûlé, à cause de la pollution atmosphérique que cela induirait, ni être réutilisé, en raison de sa toxicité (MDDEP, 2011). Il est donc souvent entreposé, engendrant une pollution des sols sous-jacents par les produits toxiques lessivés. Bien que ces produits puissent être dégradés dans le sol par les microorganismes, cette dégradation est souvent très lente. Parmi ces micro-organismes, les champignons lignivores sont connus pour dégrader les produits biocides et peuvent être utilisés comme agent de biorestauration (Anastasi *et al.*, 2008 ; Kamei *et al.* 2010). Pourtant, le choix des agents de biorestauration est souvent particulièrement ciblé (Mori et Kondo, 2002a ; Mori et Kondo, 2002b ; Ishii *et al.*, 2009) ou repose parfois sur des criblages longs et fastidieux de micro-organismes (Manji et Ishihara, 2003 ; Kamei *et al.*, 2005 ; Sierra-Alvarez, 2007).

Gold et Alic (1993) ont mis en évidence la dégradation d'une polychlorodibenzodioxine par le basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium*. Ces auteurs ont pu déterminer le mécanisme de dégradation mis en jeu par ce champignon de pourriture blanche en caractérisant les métabolites synthétisés et les produits d'oxydation générés à

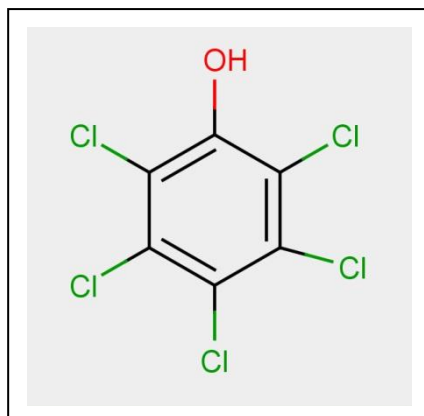


Figure 3 : Schéma en deux dimensions de la molécule de Pentachlorophénol. Cl : Chlore ; OH : Oxygène mono-hydrogéné ; les angles du noyau phényl sont des molécules de Carbone.

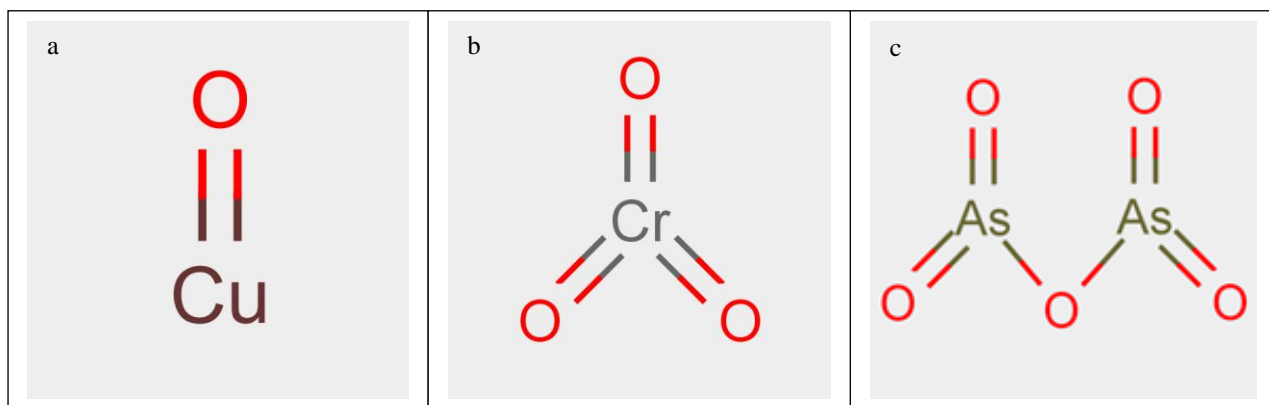


Figure 4 : Schémas en deux dimensions des molécules d'Oxyde de Cuivre (Cu) (a), de Trioxyde de Chrome (Cr) (b) et de Pentoxyde d'Arsenic (As) (c), qui correspondent au mélange courant retrouvé dans le CCA (Sierra-Alvarez, 2009).

partir de la lignine impliquant notamment des manganèse peroxydases (MnP). Un article de revue réalisée par Chang, en 1998, fait le point sur la dégradation des composés, de type dioxines, par les microorganismes, et en particulier sur les 2 possibilités de dégradation par les champignons soit par le biais du cytochrome P-450, soit par le biais des peroxydases et notamment la lignine peroxydase (LiP) et la MnP (Valli *et al.*, 1992). Par la suite, d'autres auteurs confirmeront l'intérêt de ces voies métaboliques dans la dégradation de certains composés chimiques : Sakaki et Munetsuna (2010) et Suhara *et al.* (2011) s'intéressent plus particulièrement au cytochrome P-450 tandis que Manji et Ishihara (2003) focalisent leurs travaux sur les peroxydases. Ces enzymes, ainsi que la laccases sont les enzymes qui catalysent le processus de dégradation extracellulaire de la lignine par les champignons lignicoles de pourritures blanches (Hiratsuka *et al.*, 2005). C'est pourquoi, les champignons utilisés dans la dégradation des polluants sont des champignons lignicoles. Ainsi, en 2010, Sakaki et Munetsuna, publient un article sur la faisabilité de méthodes de bioremediation mettant en jeu différents champignons de pourriture blanche. En 2003, Andersson *et al.* montrent que la dégradation de dioxines chlorées nécessite l'utilisation de champignons de pourriture blanche, connus par ailleurs pour être les acteurs de la dégradation de la lignine. D'autres auteurs comme Pointing (2001) mettent en évidence de nombreux autres champignons de pourriture blanche pouvant intervenir en tant qu'agents de bioremediation tels que *Phlebia Lindtneri*, *Ceriporia*, *Phanerochaete sordida*, *Bjerkandera* sp., *Cordyceps sinensis*, *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata*, *Phlebia brevispora*, *Pseudallescheria boydii*, *Coprinellus species*. En revanche, il semblerait que la dégradation de certains métaux lourds incombe aux champignons de pourriture brune tel que l'espèce *Antrodia vaillantii* (Sierra-Alvarez, 2009). De plus, même si ces champignons ne dégradent pas complètement les bois traités ou ne remédient pas totalement à la toxicité des sols pollués, ils peuvent être utilisés comme prétraitement dans le but de diminuer la quantité de substance organique avant un traitement plus radical, comme, par exemple, l'incinération (Valentín *et al.*, 2009).

Le projet sur lequel j'ai travaillé pendant ce stage de Master 2 est lié à ce contexte de prise de conscience de la nécessité de dégradation des polluants toxiques et de l'importance croissante des microorganismes dans ces processus. Une entreprise, — par soucis de secret industriel, le nom de cette entreprise ne figurera pas dans ce rapport — nous a interrogés sur les moyens de dégrader des bois traités et de remédier aux sols pollués des entrepôts de stockage de ces matériaux. Il s'agit de poteaux électriques en pin rouge, *Pinus resinosa*, traités au pentachlorophénol (PCP) (Figure 1) et à l'arséniate de cuivre chromaté (CCA) (Figure 2). Le CCA est surtout utilisé pour traiter des bois utilisés à l'extérieur. Le cuivre y est

utilisé comme fongicide, l'arsenic comme insecticide et le chrome sert à fixer ces molécules dans le bois (Sierra-Alvarez, 2009). Alors que le cuivre est assez peu toxique pour les mammifères, l'arsenic est connu pour être carcinogène pour l'homme (Sierra-Alvarez, 2009). Des risques d'intoxications ne sont pas écartés lors de contact répétés avec du bois traités au CCA, notamment chez des enfants en contact régulier avec des aires de jeux construites avec du bois traités (MDDEP, 2011). Le PCP, en revanche, n'est plus autorisé dans les constructions en contact avec les hommes, depuis les années 1990 dans beaucoup de pays. Et, même si son utilisation se veut décroissante voire nulle dans certains pays d'Europe tels que la France, grâce à la directive biocide, beaucoup de bois traité, à visée industrielle, comme des poteaux électriques ou des traverses de chemins de fer, en été encore imprégnées au début des années 2000 (Hansen *et al.*, 2004). En effet, le PCP est un puissant biocide qui permet une grande résistance aux agents de dégradation (Hansen *et al.*, 2004). Bien que certains champignons soient connus pour altérer particulièrement les phénols polychlorés, dont le PCP (Mileski *et al.*, 1988 ; Lamar *et al.*, 1990), et d'autres, les métaux lourds, dont le CCA (Sierra-Alvarez, 2007 ; Sierra-Alvarez, 2009), à l'heure actuelle, aucun traitement simultané pour remédier aux bois traités et aux sols pollués par le PCP et le CCA n'a été développé (CEMRS, 2012).

On peut penser que les sols tropicaux sont particulièrement riches en microorganismes en relation à la grande diversité d'espèces qui composent ces écosystèmes. Indubitablement, les conditions du milieu sont réunies pour le bon développement des champignons lignivores. En effet, trois critères indispensables à leur vie et leur survie sont inhérents à la forêt guyanaise : les températures moyennes varient peu, autour de 26°C (Blancaneaux, 1981), température idéale pour la croissance des champignons (Kamei *et al.*, 2010) ; l'humidité moyenne est forte, dont la moyenne se situe entre 82%, en septembre, et 89%, en octobre (Blancaneaux, 1981) ; la litière du sol est fréquemment renouvelées, et apporte ainsi les nutriments nécessaires aux champignons de dégradation du bois, qui survivent dans le sol grâce à celle-ci (Winqvist *et al.*, 2008). De plus, Kamei *et al.* (2010) concluent que le facteur le plus important pour la biodégradation des polluants est la teneur en eau, eau qui est apportée en abondance par les précipitations caractéristiques du climat équatorial de la Guyane française, de 2000 mm, minimum, en zone côtière, à plus de 3500 mm, dans les terres, par an (Blancaneaux, 1981).

Pour répondre à la demande qui nous a été faite et forts de cet état de l'art, il fallait se demander s'il était possible d'identifier des espèces de champignons des sols de Guyane française capables de dégrader des bois traités au PCP et au CCA, et, par extension, de

remédier aux sols pollués par ces composés chimiques. Pour ce faire, l'étude porte sur la capacité des microorganismes des sols de Guyane française à dégrader certains bois tropicaux et le Pin rouge, *Pinus resinosa*, et sur leur faculté à dégrader les bois traités utilisés par l'entreprise. L'objectif est de comparer la dégradation du bois, par sa perte de masse, dans différents types de sol de Guyane et entre un sol de Guyane et un sol de la Réunion pour essayer de mettre en évidence un indicateur de l'activité fongique des sols de Guyane. Il consiste également à évaluer l'aptitude des microorganismes des sols de Guyane à dégrader le Pin rouge, *Pinus resinosa*, traité au PCP et au CCA, et d'identifier les champignons qui contribueraient à cette dégradation. Si l'approche anatomo-morphologique classique est toujours nécessaire pour les identifications, les méthodes moléculaires ont permis de considérablement progresser dans ce domaine ; des outils moléculaires comme la PCR et le séquençage seront donc utilisés pour réaliser les caractérisations des espèces.

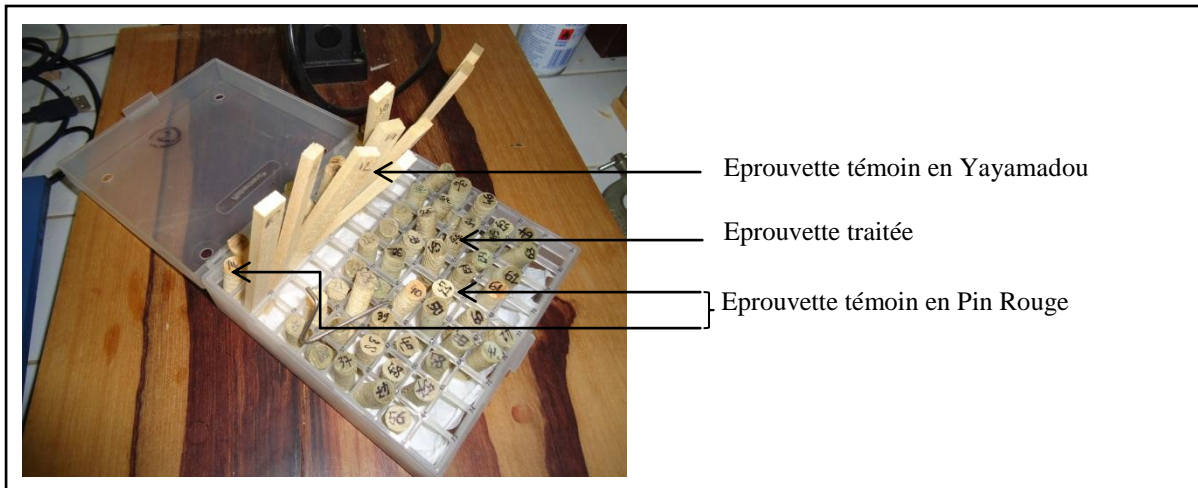


Figure 3 : Epreuves traitées et témoins.
On différencie les épreuves traitées des témoins par leur couleur bleutée.

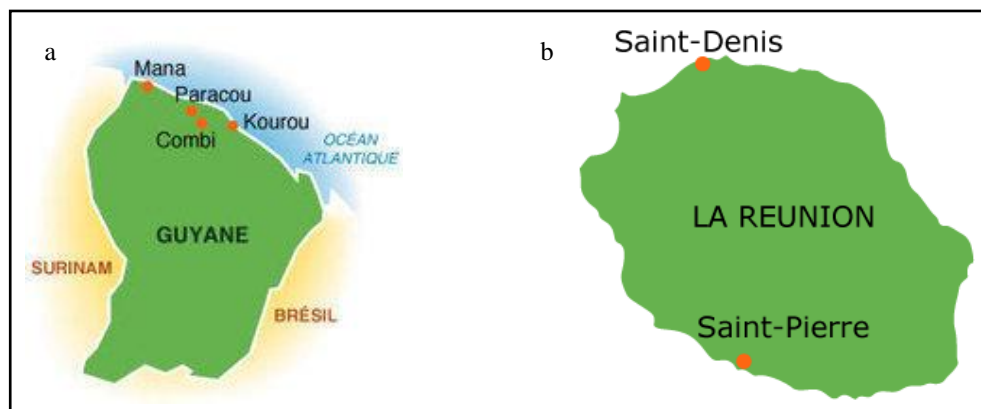


Figure 4 : Cartes de la Guyane (a) et de la Réunion (b) avec les lieux d'intérêt pour l'étude
© CIRAD.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

L'ensemble des essais a été fait à partir de carottes ou de petits échantillons allongés de bois. Les essais sur les différents types de sol dans la station de Paracou et à Kourou ont été réalisés sur des échantillons mesurant 100 mm pour la dimension longitudinale et 10×5 mm² (ou 10mm x 5mm) pour les dimensions transversales, en *Simarouba amara* Aubl.. Les essais sur les bois pollués ont été réalisés à partir de carottes de 1 cm de diamètre et de longueur variant entre 1,5 cm et 4 cm (Figure 3). Elles ont été prélevées sur des poteaux électriques en Pin rouge, *Pinus resinosa* (Kral, 1993), traités au CCA ou au PCP. Les carottes prélevées sur les poteaux traités au PCP l'ont été à deux endroits différents : au niveau du sol (PCP_{sol}) et à 1 mètre du sol (PCP_{1m}). Le PCP est connu pour présenter une migration (délavage) du bois vers le sol très rapide. C'est pourquoi, dans le cas de bois traités au PCP, deux types d'échantillons sont prélevés : un premier, prélevé à la ligne du sol et un second à 1 mètre au-dessus de la ligne du sol. L'expérience pourra ainsi montrer dans quelle mesure la répartition du produit dans le poteau a un effet sur la biodégradation par des espèces fongiques. Pour les essais sur les bois pollués en Guyane, les témoins étaient en Pin rouge et en Yacamadou, *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb). Les premières ont un diamètre de 1cm et mesurent environ 4 cm, les secondes mesurent 5mm × 10mm × 100mm (Figure 3)

2. Mise en place des essais

a. Suivi de la dégradation d'éprouvettes de *Simarouba amara* Aubl. dans différents types de sol de Guyane.

Des éprouvettes de *Simarouba*, non traitées ont été mise en place dans 8 sols différents : sable blanc en site forestier en haut de colline (site A) ou en bas de colline (site B), sable blanc en savane en haut de colline (site C) ou en bas de colline (site D), sol sableux sur le campus agronomique de Kourou (site E), sol de type terra firme sur cuirasse latéritique pour les plantations de Pin (site F), de *Simarouba* (site G) ou d'Angélique, *Dicorynia guianensis* Amshoff, (site H). Tous ces essais se sont déroulés dans la station de Paracou hormis ceux du campus, à Kourou (Figure 4a). Ces deux sites Sont gérés par le CIRAD, il est donc facile d'y installer des essais. Les éprouvettes d'essais placées dans le sable blanc en bas de colline n'ont pas pu être exploitées car le milieu a été inondé pendant une partie de l'essai. Sur chaque site, il y avait 5 dispositifs (répétitions), compartimentés en 6 repères. Le 01/12/2011, cinq repères ont été mises en place. Les éprouvettes ont ensuite été prélevées mensuellement, pendant 5 mois, repère par repère. Les éprouvettes utilisées dans les analyses



Figure 5 : Photographie d'un conteneur après la mise en place des éprouvettes dans le sol, le 01/04/2010.

de l'étude sont celles ayant été prélevée entre 167 et 185 jours car cela permettait un contact plus long entre les microorganismes du sol et les éprouvettes de bois et tous les sites sont représentés dans cette intervalle de temps.

b. Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de la Réunion.

Des éprouvettes de Pin rouge traitées aux PCP et au CCA ont été installées dans un dispositif contenant du sol de la station de Bassin Plat à Saint Pierre à la Réunion (Figure 4b). Les éprouvettes sont réparties en trois dispositifs, dont chacun correspond à un traitement : CCA, PCP_{sol} ou PCP_{lm}, respectivement. Les dispositifs comprennent chacun 5 lignes et 8 colonnes. Les éprouvettes sont identifiées par une lettre, désignant la ligne, et un nombre, désignant la colonne. Les éprouvettes du dispositif 1 (CCA) sont nommées de A1 à H5, celles du dispositif 2 (PCP_{sol}) de A11 à H15 et celles du dispositif 3 (PCP_{lm}) de I6 à P10. Les éprouvettes ont été prélevées après avoir été laissées un an dans le sol.

c. Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de Guyane.

Des éprouvettes de Pin rouge traitées aux PCP et au CCA ont été installées dans un dispositif contenant du sol forestier de la station de Paracou, qui fait partie du réseau des placettes permanentes du CIRAD en Guyane (Figure 4a). Les éprouvettes sont réparties en trois dispositifs, dont chacun correspond à un traitement : CCA, PCP_{sol} ou PCP_{lm}, respectivement. Chaque dispositif contient trois répliquas qui correspondent à trois conteneurs par traitement. Les éprouvettes sont donc réparties dans 9 conteneurs numérotés de C1 à C9, sur 14 lignes et 9 colonnes. Ainsi, C1, C2 et C3 sont les essais sur le CCA, C4, C5 et C6 sur le PCP_{sol} et C7, C8 et C9 sur le PCP_{lm}. Chaque conteneur contient 126 éprouvettes : entre 70 et 80 éprouvettes traitées et entre 46 et 56 éprouvettes témoins (Figure 5). Au total, 1139 éprouvettes composent l'expérimentation (Figure 6). Les éprouvettes qui ont servies à la comparaison avec le sol de la Réunion avaient été prélevées au bout de 6 mois de mise en terre. Celles utilisées pour les comparaisons de dégradation des traitements et pour les analyses moléculaires ont été prélevées au bout de 2 ans de mise en terre.

3. Mesure de la perte de masse

Les éprouvettes qui ont été prélevées pour le calcul de la perte de masse sont identifiées, brossées, lavées et essuyées. Elles sont pesées une première fois à ce taux d'humidité avec la balance Sartorius CP224S et le logiciel Software Wedge. Les éprouvettes sont ensuite placées dans des papillotes de papier aluminium sur lesquelles sont notés leur numéro d'identification et qui sont ouvertes sur le dessus pour laisser libre court à l'évaporation. Les éprouvettes ainsi disposées sont placées dans une étuve à 103°C pendant

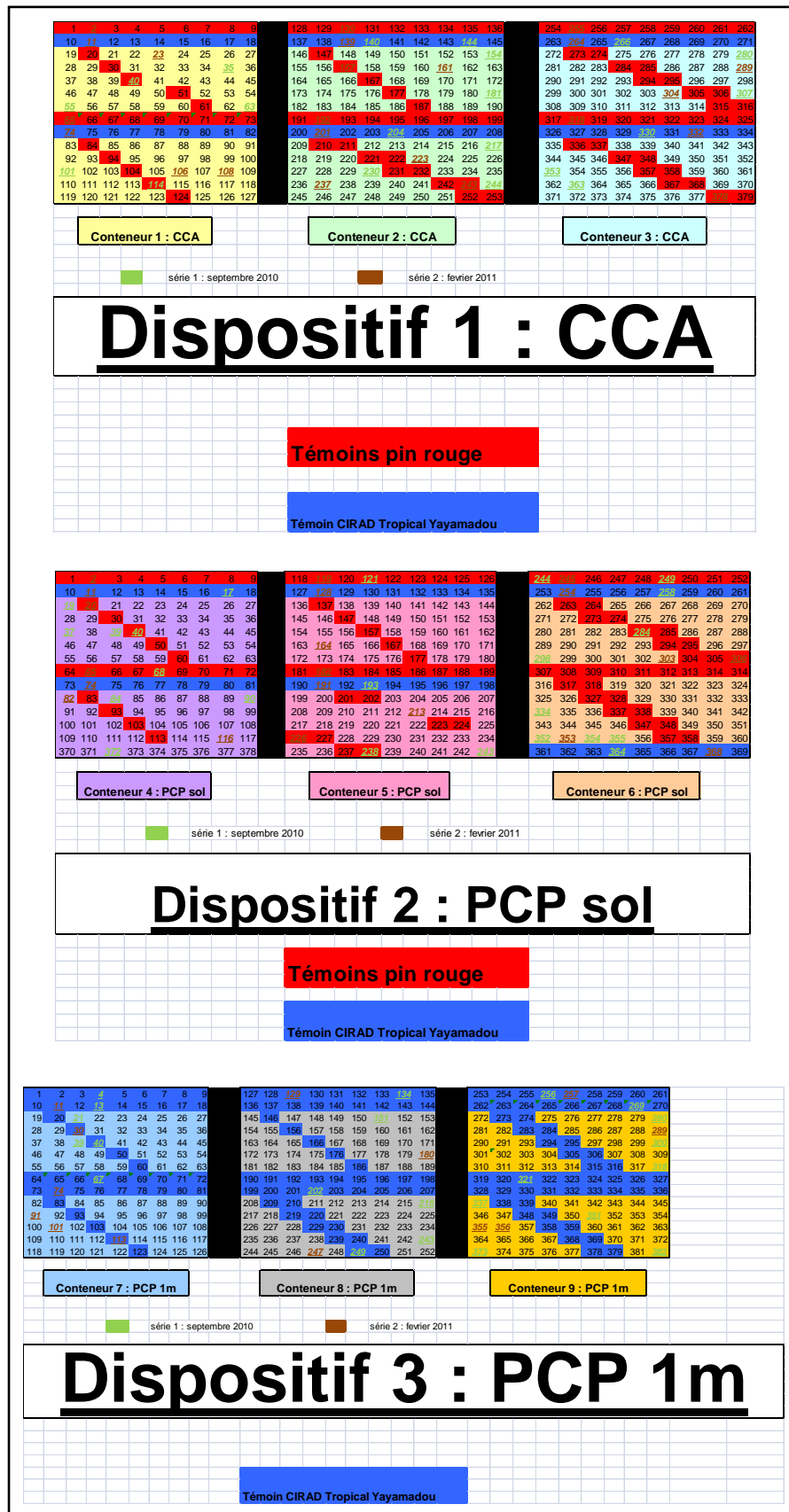


Figure 6 : Schéma des conteneurs pour les essais sur les bois traités au PCP et au CCA. Les séries 1 et 2 correspondent à des retraits d'éprouvettes en 2010 et 2011. Le reste des éprouvettes a été retiré cette année (en 2013) pour les calculs de perte de masse ou pour les analyses moléculaires.

48h. Ensuite, les éprouvettes sont sorties de l'étuve puis pesées une seconde fois pour obtenir leur masse anhydre.

Le calcul de la perte de masse est le suivant (Schmidt, 2006) :

$$\Delta M = \frac{M_0 - M_1}{M_0} * 100$$

où ΔM est la perte de masse en pourcentage, M_0 est la masse anhydre des éprouvettes en grammes avant leur mise en place dans le sol des essais et M_1 est la masse anhydre des éprouvettes prélevées des dispositifs.

4. *Suivi des populations fongiques*

Le suivi des populations fongiques est réalisé au moyen d'outils de biologie moléculaire (extraction de l'ADN, amplification, séquençage et comparaison de séquences par BLASTn).

a. *Réduction des éprouvettes en poudre*

La réduction des éprouvettes de bois en poudre est effectuée sous un dispositif ressemblant à une hotte d'extraction dans un entrepôt aéré, afin de ne pas inhaler de poussières de bois. De plus, pour éviter tout contact avec le PCP ou le CCA, les ports de gants et d'un masque sont nécessaires et obligatoires selon les directives du CIRAD. Les éprouvettes sont réduites en poudre au moyen d'une râpe à trous de diamètre 3 mm. Une feuille de papier aluminium est placée sous le dispositif afin de récupérer la poudre de bois. La poudre obtenue est ensuite placée dans un tube de 50 mL, identifié par leur numéro CIRAD, c'est-à-dire par : le numéro que l'échantillon possédait dans le conteneur (Figure 6), le traitement du bois (CCA, PCP sol ou PCP 1m), et la date à laquelle il a été prélevé. La râpe est lavée passée au chalumeau entre chaque traitement d'échantillon. La feuille de papier aluminium et les gants en latex sont à usage unique, changés entre chaque préparation d'échantillon afin d'éliminer le risque de contamination par transfert d'ADN fongique entre échantillons. Les tubes préparés sont immédiatement conservés au congélateur à -24°C.

b. *Extraction de l'ADN*

Le protocole utilisé est le protocole commercialisé dans le kit de purification de l'ADN des plantes d'Invitrogen (PureLink Plant Total DNA – Purification Kit – For purification of DNA from plant), amélioré par Lecoœur (2012) (Annexe 2). Chaque échantillon, environ 200 mg de poudre de bois, est transféré dans un tube Eppendorf® de 2 mL, identifié par son numéro de laboratoire. Le matériel utilisé est désinfecté avec de l'alcool à 100%.

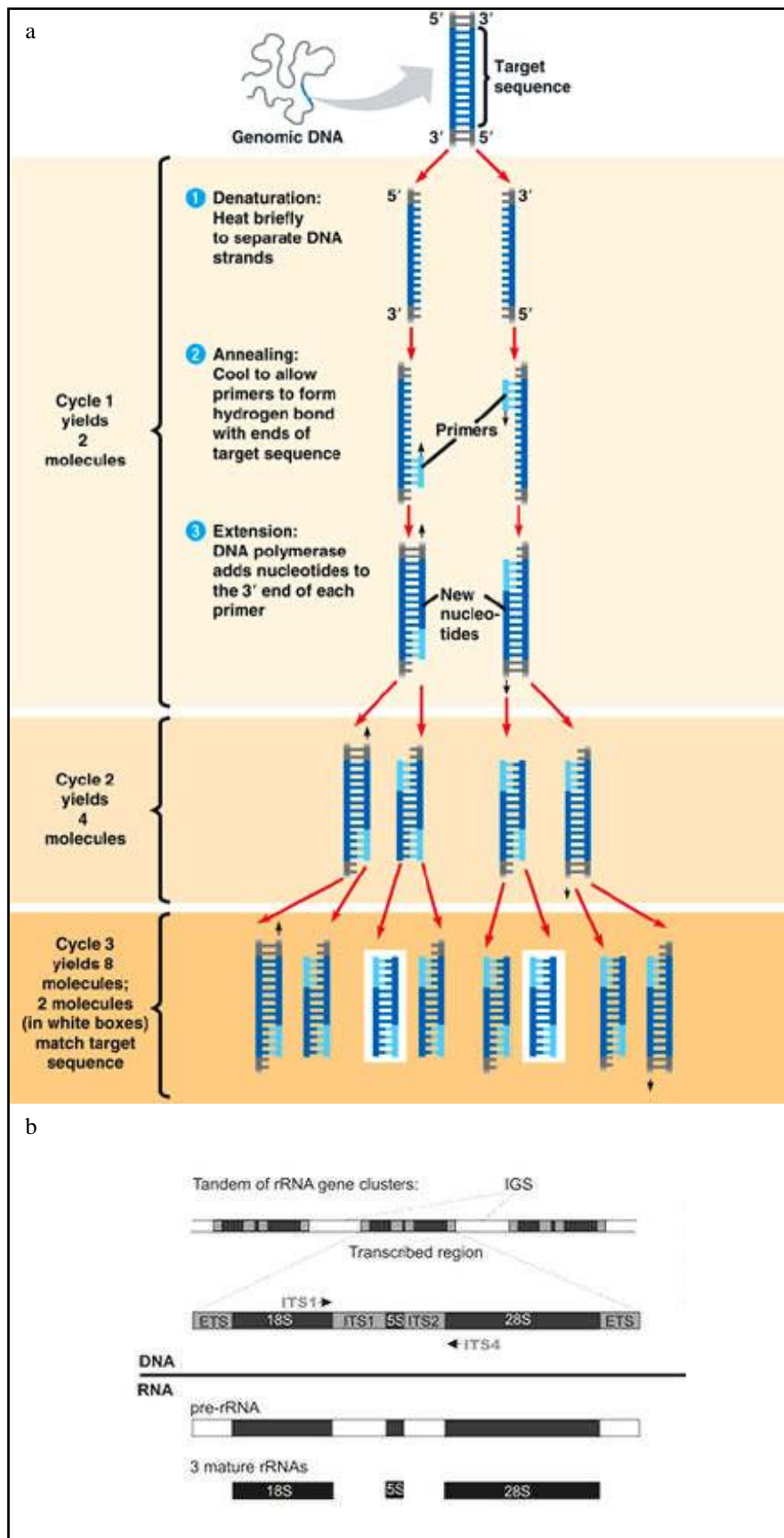


Figure 7 : Description de la PCR (a) et amorces utilisées : ITS1myc et ITS4-myc (b)

c. Quantification

Après l'extraction, l'ADN total est quantifié par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre Shimadzu biotech®. Contrairement à un spectrophotomètre classique, seul 1 à 2 µL d'échantillon suffisent pour la quantification. Cet appareil mesure l'absorbance à 260 et 280 nm. Il s'agit respectivement de la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance de l'ADN est maximale, et celle pour laquelle l'absorbance des protéines est maximale. Le logiciel de l'instrument calcule directement la concentration (ng/mL) en ADN de l'échantillon pour une lecture immédiate du résultat. Les ratios A1/A2 (260/280 nm) et A1/A3 (260/230 nm) ainsi que la concentration de notre ADN ont été mesurés afin de déterminer le succès de notre extraction ainsi que la pureté de nos échantillons. Les ratios A1/A2 et A1/A3 doivent se rapprocher de 1,8 pour pouvoir qualifier les échantillons de « purs ».

d. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La technique PCR, maintenant courante en biologie moléculaire, permet la réplication in vitro d'un fragment d'ADN (Figure 7a). Cette méthode mise au point par Mullis (1985) permet d'obtenir en grande quantité un fragment spécifique d'ADN à partir d'une quantité initiale très faible. La PCR comprend trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Ces étapes qui forment un cycle sont répétées afin d'obtenir une importante quantité d'ADN. Lors de cette réaction, l'ADN n'est pas entièrement répliqué, seul le fragment d'intérêt l'est. Il s'agit de la séquence du fragment d'intérêt délimité par un couple d'amorce. Dans notre étude, le couple d'amorce est ITS1-myc (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS4-myc (5'-TCCTTCCGCTTATTGATATGC-3'). La séquence recherchée comprend les régions ITS1 ; 5,8S ; ITS2 (Figure 7b) (Annexe 3.1).

e. L'électrophorèse

Après une PCR, les fragments d'intérêts amplifiés sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose. La concentration du gel en agarose varie en fonction du poids moléculaire des fragments d'ADN à mettre en évidence. Ici, la concentration du gel est 1,5% d'agarose. L'observation sous lumière UV (590 nm) permet d'estimer l'intensité de la réaction de PCR, de vérifier l'intégrité et la taille de nos fragments d'ADN avant de faire séquencer nos échantillons (Annexe 3.2).

f. Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à retrouver l'enchaînement de ses nucléotides. La méthode la plus couramment utilisée pour le séquençage est celle de Sanger. Cette technique

consiste à répliquer l'ADN (en séparant les brins complémentaires) en ajoutant des didésoxyribonucléotides (ddNTP) parmi les désoxyribonucléotides (dNTP) (Annexe 3.3).

Les produits PCR sont envoyés pour séquençage : 30 µL de chaque produit PCR et 10 µL par échantillon de chaque primer forward (10 µM) au laboratoire d'AGAP à Montpellier.

g. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Une fois les séquences obtenues, nous réaliserons une comparaison par BLASTn avec la base de données du NCBI afin d'identifier le genre et/ou l'espèce de l'isolat. Le BLAST, Basic Local Alignment and Search Tool, (Altschul *et al.*, 1997) est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Annexe 3.4).

5. Analyses statistiques

L'analyse des pertes de masse des éprouvettes visent à essayer d'évaluer si les différences de perte de masses entre plusieurs sites ou traitements sont significatifs. Les variances de ces données ne sont pas réparties de façon normale, même après transformation logarithmique des variables, qui était la transformation la plus adaptée à la distribution, et après celle, plus générale, du Box-Cox. C'est pourquoi le type de test choisi ici est une ANOVA non paramétrique à un critère de classification de Kruskal-Wallis. Puis, si ce test permet de rejeter l'hypothèse H_0 d'unicité de la population, c'est-à-dire, ici par une P-value > 0.05, les données seront soumises au test de comparaison multiple de Siegel & Castellan (1988) pour évaluer les différences entre groupes.

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel *R* 3.0.1.

Tableau 3 : résultats des tests de Kruskal-Wallis entre les pièges pour chaque site

Sites	X^2	df	P-value
Forestier Haut	3.24	4	0.518
Forestier Bas	10.34	4	0.0350
Sable Blanc Haut	15.98	4	0.00304
Campus	22.13	4	0.000189
Pin	15.23	4	0.00425
Simarouba	14.61	4	0.00559
Angélique	11.89	4	0.0182

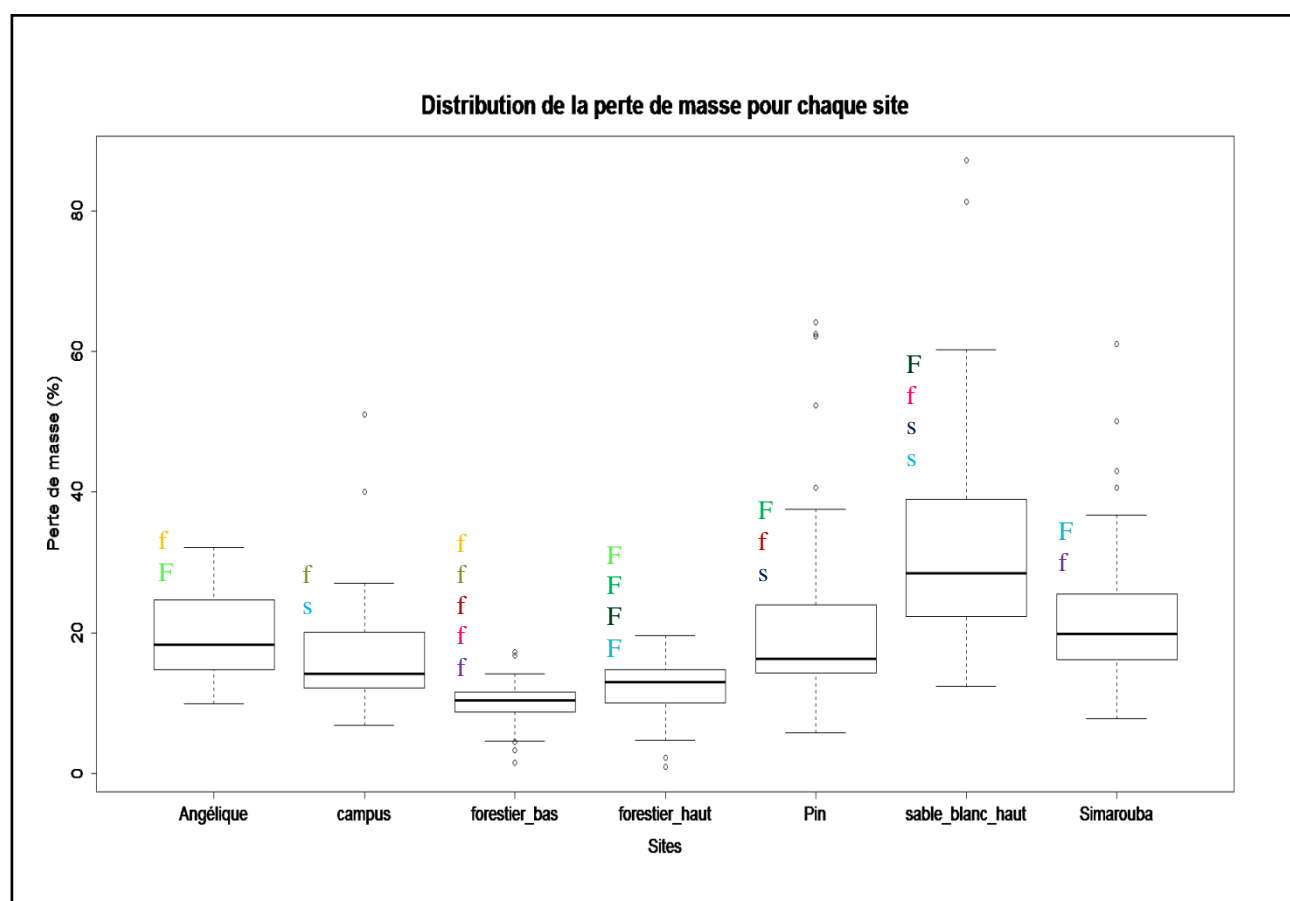


Figure 8 : Comparaison de la perte de masse entre les sites de Paracou et Kourou. Les sites significativement différents entre eux, deux à deux, sont légendés par une lettre et une couleur. Les pièges légendés par « f » sont significativement du site « forestier bas », ceux légendés par « F » du site « forestier haut » et ceux par « s » du site « sable blanc haut ».

RESULTATS

1. *Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Simarouba amara dans différents types de sol de Guyane.*

Les différences dans la dégradation des éprouvettes de *Simarouba amara* dans 7 types de sol donnés (forestier haut, forestier bas, sable blanc haut, campus, Pin (plantations de), Simarouba (plantations de), Angélique (plantations de)) ont été estimées grâce aux différences de perte de masse des échantillons dans chaque type de sol, appelés « Sites ». Cette variation est représentée sur la Figure 8 qui montre les degrés de dispersion des pertes de masse pour chaque type de sol. Ainsi, on peut voir que la plupart des pertes de masse des éprouvettes pour chaque site se situe autour de 20% sauf pour les sites forestiers, entre 10% et 15% et le site « sable blanc haut », dont les pertes de masse sont plus étendues, entre 20% et 40%. Le test non paramétrique à un facteur de classification de Kruskal-Wallis sur ces données confirme les différences entre les types de sol par l'obtention du résultat suivant : $P\text{-value} = 1,35.10^{-10}$ ($df = 6$ et $\chi^2 = 57,65$). Le test de comparaison multiple qui suit le test de Kruskal-Wallis met en évidence plus particulièrement les différences entre chaque site. Il en ressort des différences significatives entre le site « forestier haut » et les sites de plantation (Pin, Simarouba et Angélique) et le site « Sable blanc haut », entre le site « forestier bas » et tous les sites autres que « forestier haut », entre le site « Sable blanc haut » et les sites « Campus » et « Pin » (Figure 8).

On remarque sur la Figure 8 que les sites forestiers correspondent à la plus faible perte de masse et que les sites de sable blanc correspondent à la plus importante. Cependant, la dispersion des pertes de masse sur certains sites de la Figure 8 sont assez étendus, notamment pour le site « sable blanc haut », c'est pourquoi il fallait se demander si la variation des conditions du milieu à l'intérieur du site, entre pièges, était significative et, le cas échéant, si certains pièges pouvaient éventuellement être considérés comme des sites à part entière.

Les résultats des tests de Kruskal-Wallis pour chaque site, entre les pièges sont représentés dans le tableau 1 et le graphique des degrés de dispersion de la perte de masse pour chaque piège à l'intérieur des différents sites sur la Figure 9. On remarque que la perte de masse pour les différents pièges se situe, pour la plupart d'entre eux dans les bornes décrites ci-dessus, mais que pour presque tous les sites, sauf le site « forestier haut », un piège ne respecte pas cette dispersion. Il s'agit du piège 5 pour les sites « Forestier bas » et « Sable blanc haut », du 4 pour « campus », du 2 pour « Pin », du 1 pour « Simarouba » et des 1 et 5 pour « Angélique ». Ainsi, l'hypothèse d'unicité des variables (H_0) entre les pièges d'un site

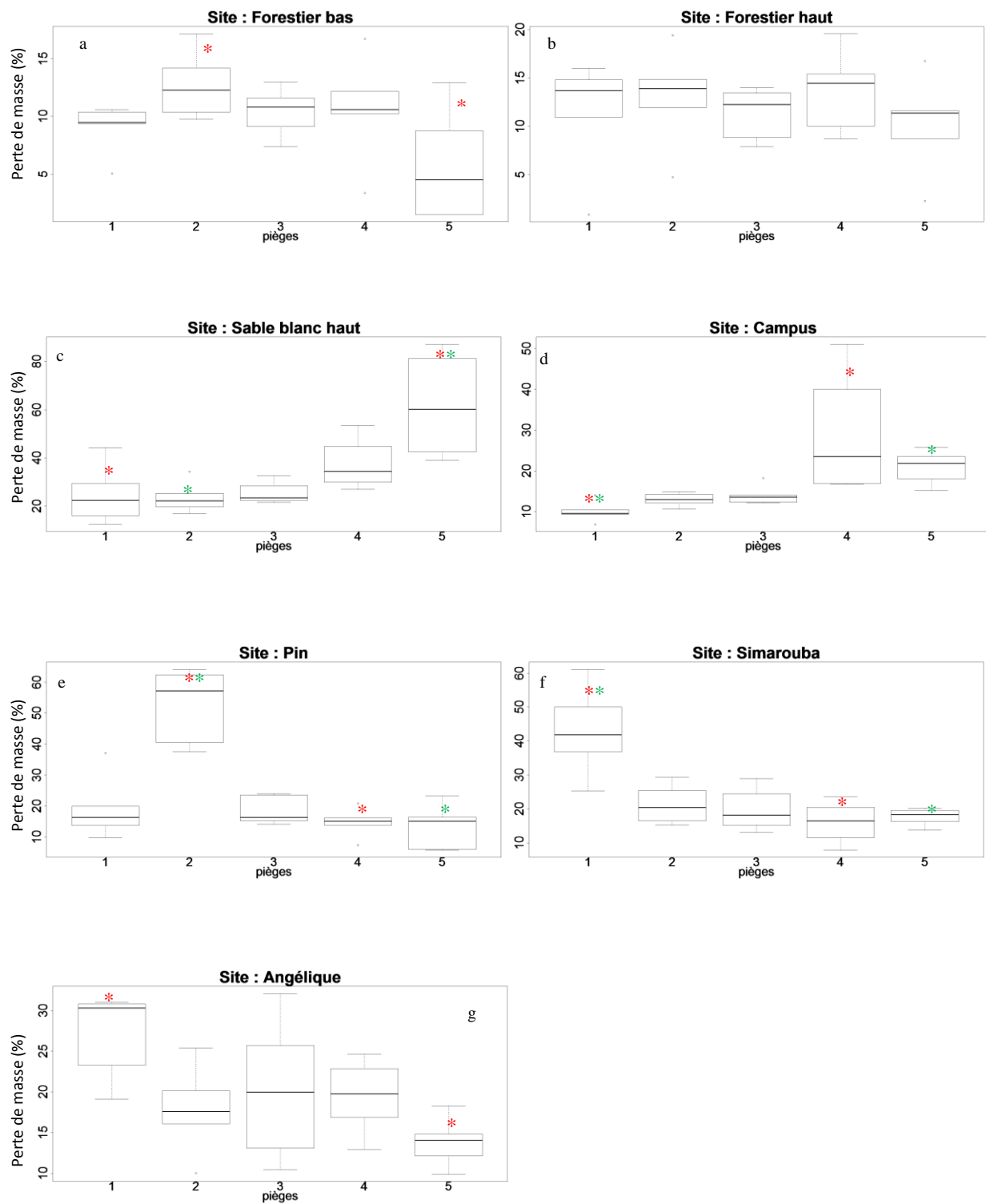


Figure 9 : Comparaison de la perte de masse pour chaque piège dans les différents sites. Les pièges dont les pertes de masse sont significativement différentes à l'intérieur de chaque site sont notées par le signe * et chaque couleur correspond à un couple de pièges significativement différents.

donné ne doit être conservée que pour le site forestier haut (Figure 9b). Le test de comparaison multiple après le test de Kruskal-Wallis est effectué pour les autres sites. Ainsi, les sites « Angélique » et « Forestier bas » ont 2 pièges significativement différents (Figures 9a et 9g) et les 4 autres sites ont un piège qui se différencie particulièrement de deux autres (Figure 9c-f). Les différences entre les sites et ces 4 pièges pris comme site à part entière ont été testées de la même façon. La différence entre ces nouveaux sites n'est pas significative d'après le test de Kruskal-Wallis : P-value = 0,522 (df = 4 et $\chi^2 = 3,218$) : on accepte l'hypothèse H_0 d'unicité des variables. Donc, l'augmentation du nombre de site tend à supprimer les différences.

2. *Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de la Réunion.*

Les différences dans la dégradation des éprouvettes de *Pinus resinosa* dans un sol de Guyane et dans un sol de la Réunion ont été estimées grâce aux différences de perte de masse des échantillons dans chaque sol. Cette variation est représentée sur la Figure 10 qui montre les degrés de dispersion des pertes de masse pour chaque type de sol. La perte de masse des éprouvettes mises en place à la réunion sont plus faibles que celles mises en place en Guyane. Pour le CCA, cette différence est d'environ 5%. Elle est de 10% environ pour le PCP. Le test non paramétrique à un facteur de classification de Kruskal-Wallis sur ces données confirme les différences entre les types de sol (Figure 10) par le rejet de l'hypothèse d'unicité des variables, H_0 .

3. *Suivi de la dégradation d'éprouvettes de Pin rouge dans un sol de Guyane.*

a. *Perte de masse des éprouvettes traitées*

Les différences dans la dégradation des éprouvettes de *Pinus resinosa* pour 3 types de traitements donnés (CCA, PCP_{sol}, PCP_{lm}) ont été estimées grâce aux différences de perte de masse des échantillons pour chaque traitement. Cette variation présentée sur la Figure 11 montre les différents degrés de dispersion des pertes de masse pour chaque traitement. La perte de masse des éprouvettes traitées au CCA est légèrement dispersée autour de 18%. Celle des éprouvettes traitées au PCP se situe autour de 30%. Le test non paramétrique à un facteur de classification de Kruskal-Wallis sur ces données confirme les différences entre les traitements par l'obtention du résultat suivant : P-value = $9,93.10^{-09}$ pour df = 2 et $\chi^2 = 36,86$. Le test de comparaison multiple après Kruskal-Wallis met en évidence plus particulièrement les différences entre chaque traitement. Ainsi, les différences de perte de masse sont significatives entre les éprouvettes traitées au CCA et celles traitées au PCP. En revanche, entre les deux traitements PCP_{sol} et PCP_{lm}, la différence n'est pas significative.

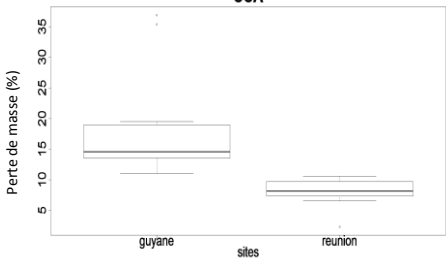
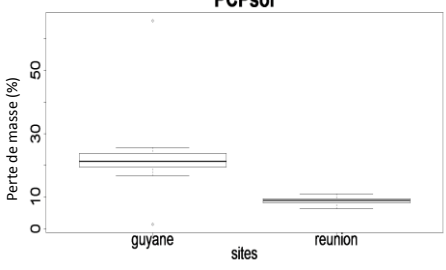
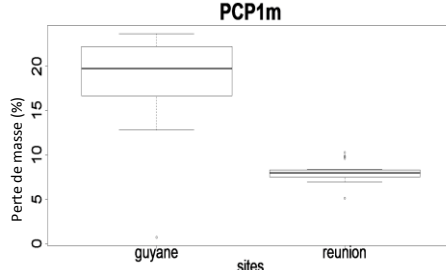
Traitement		P-value (χ^2 et df) du test de Kruskal-Wallis
a	CCA	
CCA		P-value = $9.63.10^{-07}$ ($\chi^2 = 24$ et $df = 1$)
b	PCP _{sol}	
PCP _{sol}		P-value = $9.92.10^{-05}$ ($\chi^2 = 15$ et $df = 1$)
c	PCP _{1m}	
PCP _{1m}		P-value = $9.92.10^{-05}$ ($\chi^2 = 15$ et $df = 1$)

Figure 10 : Comparaison des pertes de masse d'éprouvettes de Pin rouge traitées par différents traitements, CCA (a), PCP_{sol} (b) et PCP_{1m} (c), entre deux sites de deux régions géographiques différentes (Guyane et Réunion).

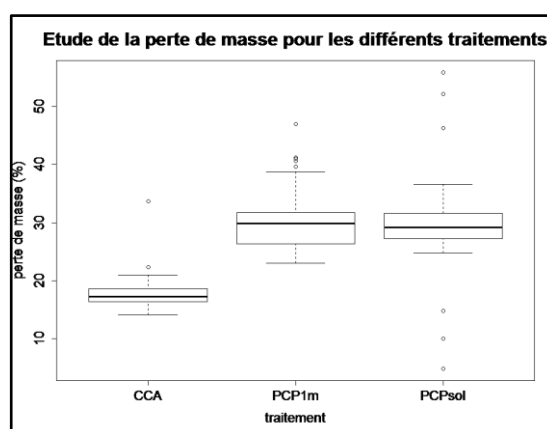


Figure 11 : Comparaison de la perte de masse pour les éprouvettes de Pin rouge soumises à différent traitement.

Ce premier résultat est obtenu sans tester l'effet des conteneurs sur les résultats des pertes de masse. C'est pourquoi il fallait se demander s'il y avait une différence significative entre les pertes de masse des éprouvettes traitées avec un des 3 traitements en fonction des conteneurs. Ces résultats sont présentés en Figure 12. Ainsi, on remarque une différence assez importante entre les conteneurs pour le traitement PCP_{1m} alors que les conteneurs des deux autres traitements ne montrent pas de différence flagrante. Les résultats des tests de Kruskal-Wallis (Figure 12) confirment l'hypothèse d'unicité des variables de perte de masse entre les 3 conteneurs où sont mis en place celles traitées au CCA et les 3 conteneurs où sont mis en place celles traitées au PCP_{sol}. En revanche le test de Kruskal-Wallis invalide cette hypothèse pour les 3 conteneurs où sont mises en place les éprouvettes traitées au PCP_{1m}. Le test de comparaison multiple après Kruskal-Wallis met en évidence que le conteneur 7 est significativement différent des conteneurs 8 et 9.

Après ces résultats, le premier test a été repris pour voir si la considération du conteneur 7 en tant que traitement à part entière changeait les résultats du premier test de comparaison des pertes de masse entre les différents traitements. Le graphique de ce résultat est présenté en Figure 13. Le résultat du test de Kruskal-Wallis permet de conclure à une différence entre les 4 sites : CCA, PCP_{sol}, PCP_{1m}C7 (conteneur 7) et PCP_{1m}C8C9 (conteneurs 8 et 9). En effet, $P\text{-value} = 1,38.10^{-9}$ ($\chi^2 = 44$ et $df = 3$). Le test de comparaison multiple après Kruskal-Wallis met en évidence que la plupart des traitements ont des pertes de masse significativement différentes des autres traitements sauf le PCP_{sol} et les PCP_{1m}C7 et PCP_{1m}C8C9.

b. Perte de masse des éprouvettes témoins

Les conteneurs dont les éprouvettes étaient traitées au CCA et au PCP_{sol} contenaient également des éprouvettes témoins en Pin rouge et en Yayamadou. Pour ceux contenant celles traitées au PCP_{1m}, ils ne contenaient que des éprouvettes témoins en Yayamadou. Dans les conteneurs des traitements CCA et PCP_{sol}, les éprouvettes Yayamadou sont totalement dégradées alors que toutes ne le sont pas dans les conteneurs PCP_{1m}. Ces éprouvettes témoins ont une perte de masse moyenne de 88,03% (Ecarttype = 2,829 et Variance = 5,337). Les éprouvettes témoins en Pin Rouge ne sont jamais totalement dégradées. La comparaison des pertes de masse de ces éprouvettes en fonction des traitements est représentée dans la Figure 14. On remarque que celles des conteneurs CCA ont une perte de masse qui varie entre 65% et 85% alors que celles des conteneurs PCP_{sol} varient entre 45% et 65%. Le test non paramétrique à un facteur de classification de Kruskal-Wallis ne permet pas de rejeter H_0 (unicité de la variable) par l'obtention du résultat suivant : $P\text{-value} = 0,0550$ pour $df = 1$ et $\chi^2 = 3,681$.

c. Suivi des populations fongiques.

Les résultats concernés par ce paragraphe n'ont pas pu être obtenus dans le temps imparti au stage. Ils ne pourront donc pas figurer dans ce rapport. Mais après s'être attelé à comprendre les difficultés incombant à ce retard, les manipulations seront repris.

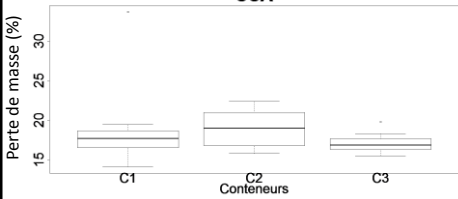
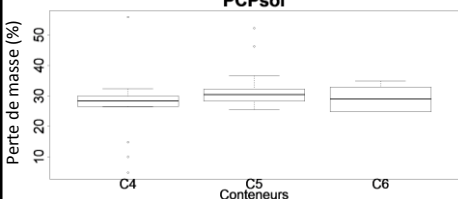
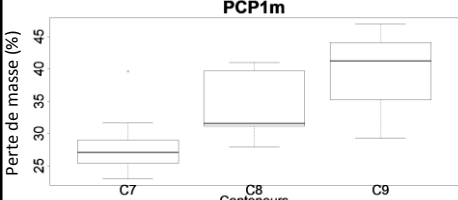
Traitement		P-value (χ^2 et df) du test de Kruskal-Wallis
a		
CCA		P-value = 0.451 ($\chi^2 = 1.59$ et $df = 2$)
b		
PCP _{sol}		P-value = 0.271 ($\chi^2 = 2.61$ et $df = 2$)
c		
PCP _{1m}		P-value = 0.00231 ($\chi^2 = 12.1$ et $df = 2$)

Figure 12 : Comparaison des pertes de masse d'éprouvettes de Pin rouge traitées par différents traitements, CCA (a), PCP_{sol} (b) et PCP_{1m} (c), dans leurs 3 conteneurs respectifs : C1, C2 et C3 pour le CCA, C4, C5 et C6 pour le PCP_{sol} et C7, C8 et C9 pour le PCP_{1m}.

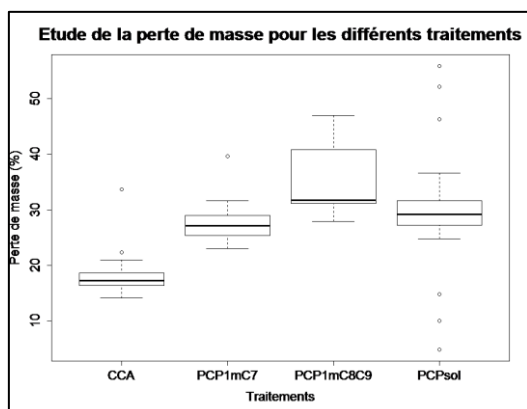


Figure 13 : Comparaison des pertes de masse pour les 3 traitements dont PCP_{1m} est divisé en 2 : le conteneur 7 (PCP_{1m}C7) et les conteneurs 8 et 9 (PCP_{1m}C8C9).

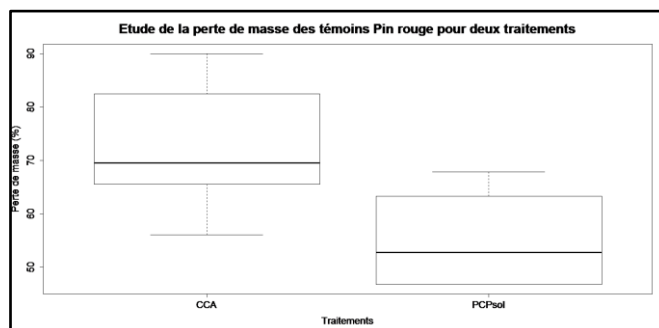


Figure 14 : Comparaisons des pertes de masse des éprouvettes témoin en Pin rouge pour les traitements CCA et PCP_{sol}.

DISCUSSION

Les résultats sur les différents types de sol montrent que certains sites se démarquent particulièrement des autres pour leur capacité de dégradation des éprouvettes de *Simarouba amara*. Alors que l'on pourrait penser que les éprouvettes en contact avec un sol forestier, où la litière est constamment renouvelée, apportant les nutriments essentiels au maintien et au développement des organismes lignicoles (Winqvist *et al.*, 2008), auraient la perte de masse la plus importante, ce type de sol se révèle être le moins efficace quand à cette dégradation. Les autres types de sol de plantations (Pin, Simarouba et Angélique) voient leurs éprouvettes subir une perte de masse légèrement plus importante. Et c'est le type de sol « Sable blanc haut » qui se différencie de façon significative de la plupart des autres sols par la perte de masse des éprouvettes de Simarouba la plus élevée. On peut penser que, dans les sols où la litière est constamment renouvelée, les organismes lignicoles contiennent assez de matière organique pour que la ressource soit partagée. Alors que, dans un sol où la litière est moins renouvelée, l'apport en matière organique est plus exceptionnel, ce qui entraînerait une focalisation des microorganismes sur celle-ci, ici, les éprouvettes de Simarouba. De plus, on remarque que, même si les pièges à l'intérieur des sites ne peuvent pas être considérés comme des sites à part entière, au moins un piège de chaque site (sauf pour le site forestier haut) se démarque des autres pièges en terme de perte de masse des éprouvettes de Simarouba. Cela met en évidence que la variabilité entre les sites est doublée d'une variabilité entre les pièges qu'il faut prendre en considération dans la sélection des sols dans des études telles que celles effectuée sur la dégradation des bois traités par le CCA et le PCP. La diversité locale est même parfois plus forte que celle du site.

Les essais mis en place dans un sol de Guyane et un sol de la Réunion, montrent une différence significative de la dégradation des éprouvettes de Pin rouge entre ces deux types de sol en faveur du sol de Guyane. Le temps de maintien au sol confirme ces résultats étant donné que les éprouvettes mises en place à la Réunion ont été au sol deux fois plus longtemps que celles mises en place en Guyane (10 mois et 5 mois, respectivement).

Ces résultats mettent en évidence que le choix d'établir les essais sur la dégradation des bois traités au CCA et au PCP en Guyane, dans un sol forestier provenant du site de Paracou est justifié en comparaison du site de Bassin Plat à la Réunion. Cependant, ils pourraient mettre en cause le choix d'avoir utilisé des sols forestiers de Paracou dans ces essais, car les éprouvettes de *Simarouba amara* sont moins dégradées dans ces sols que dans les autres sites de l'essai.

Tableau 2 : traduction des pertes de masse en classes de résistance. Cette transposition a un caractère arbitraire, mais elle permet cependant une comparaison entre diverses essences ou entre divers échantillons d'une même essence (Fougerousse, 1979).

Perte de masse en laboratoire	Classe de durabilité
Supérieure à 25%	Périssable
Entre 15 et 25%	Peu durable
Entre 10 et 15%	Moyennement durable
Entre 5 et 10%	Durable
Inférieur ou égale à 5%	Très durable

Les essais sur les bois traités montrent une différence significative de la perte de masse des éprouvettes de Pin rouge traitées au CCA et au PCP, allant presque du simple au double (respectivement 18% et 30%). D'après le barème des pertes de masse en essais laboratoire (Tableau 2), ces pourcentages de perte de masse, de 18% et 30%, classerait respectivement les éprouvettes de bois traitées au CCA et au PCP comme peu durable et périssable, après trois ans de mise en contact avec le sol – alors qu'elles sont traitées pour être très durables. A l'inverse, même si le test de Kruskal-Wallis sur les pertes de masse des éprouvettes témoins de Pin rouge ne permet pas de conclure à une différence significative entre les traitements CCA et PCP_{sol}, on remarque cependant que la perte de masse des éprouvettes témoins pour le traitement CCA est plus importante que celle du traitement PCP_{sol}. Il est à noter que la P-value est assez faible à peine supérieure à 0,05 (P-value = 0,0550 pour df = 1 et $\chi^2 = 3,681$) elle permet toutefois de signifier cette relation. De plus, les éprouvettes témoins en Yayamadou ont été totalement dégradées pour ces deux traitements alors qu'elles ne le sont pas entièrement dans les conteneurs du traitement PCP_{1m}.

Ces résultats sont à mettre en corrélation avec la capacité de lessivage des traitements : le CCA l'est peu alors que le PCP l'est beaucoup plus (Fougerousse, 1979). Ainsi, alors que les organismes lignicoles ont plus de difficultés à dégrader les éprouvettes traitées au CCA, encore très présent dans le bois, ils ont plus de facilité à dégrader le bois traité au PCP, qui a été lessivé. Par ailleurs, le CCA étant, donc, peu répandu dans le sol des conteneurs, les microorganismes y sont assez développés pour dégrader considérablement les éprouvettes témoins. En revanche, le PCP étant plus répandu dans le sol des conteneurs, les microorganismes ont plus de mal à se maintenir et dégradent moins fortement les éprouvettes témoins. Cette différence se remarque en plus entre les deux traitements PCP car les éprouvettes en Yayamadou des conteneurs PCP_{1m} ne sont pas totalement dégradées alors que le Yayamadou est une espèce très peu durable. Il y avait probablement plus de PCP dans les éprouvettes traitées au PCP_{1m} que dans les éprouvettes traitées au PCP_{sol}. En effet, ce dernier traitement correspond au bas des poteaux électriques en contact avec le sol où le lessivage et l'activité biologique était beaucoup plus importants quand ils étaient encore sur pied. En comparaison à la littérature sur la suite à la dégradation de certaines toxines (Andersson et *al.*, 2003), on peut aussi se demander si cette diminution de l'activité de dégradation n'est pas due au produits secondaires de dégradation du PCP. Il serait judicieux de les déterminer pour en estimer la toxicité.

Enfin, les différences entre les conteneurs pour un même traitement confirme le résultat d'une différence de perte de masse entre les éprouvettes traitées au CCA et celles

traitées au PCP et d'une unicité dans les pertes de masse pour les traitements PCP_{sol} et PCP_{1m} . En revanche, les pertes de masse des éprouvettes traitées du conteneur C7 (PCP_{1m}) sont significativement différentes de celles des conteneurs C8 et C9 (PCP_{1m}). Cela est explicable par une différence de bioturbation entre ces conteneurs : des invertébrés ont été recensés dans les conteneurs C8 et C9. Ils étaient très abondants dans le conteneur C8.

Chaffanel (2011) et Zaremski *et al.* (2012) mettent en évidence plusieurs souches de champignons en présence des éprouvettes traitées au PCP et au CCA au bout de 5 mois et 10 mois d'exposition. Ces auteurs montraient également que, au bout de 5 mois, les biocides n'ont pas encore d'impact sur les communautés fongiques des sols et que, après 10 mois, il était possible de différencier des champignons par type de traitement. C'est pourquoi, à la fin de l'étude, actuellement, en 2013, ces analyses devaient être répétées, pour, soit confirmer ce résultat, soit mettre en évidence des espèces de champignons capables de dégrader les deux types de polluants, CCA et PCP, ce qui n'a pas encore pu être démontré ((CEMRS, 2012). A l'heure actuelle, les résultats de ces analyses ne sont pas encore parvenus pour cause de contretemps dans la manipulation dû à une quantité faible d'ADN extrait dans les échantillons.

CONCLUSION

La dégradation des bois dans les sols est dépendante de plusieurs facteurs : le type de sols mais également l'endroit précis où se trouve l'échantillon. D'après les résultats, on remarque que les sols de Guyane diffèrent en termes de dégradation mais que leur utilisation dans les essais de dégradation des éprouvettes traitées au PCP et au CCA est judicieuse, en comparaison avec le sol de la Réunion étudié ici.

Les pertes de masse sur les éprouvettes traitées, aussi bien au PCP qu'au CCA, montrent l'efficacité du sol forestier de Paracou à dégrader efficacement le Pin rouge traité. Les résultats de cette étude confirment que le CCA est moins dégradable et moins lessivable par les microorganismes de ces sols que le PCP. Mais une question reste en suspend concernant ce dernier : la diminution de l'activité microbienne, que l'on peut mettre en évidence en regard de la perte de masse des éprouvettes témoins de ces conteneurs, est-elle seulement due au lessivage du PCP ou aux produits secondaires issus de sa dégradation ? Et donc, de se demander si les communautés des microorganismes pourront dégrader le PCP lessivé – ce qui paraît envisageable étant donné qu'ils dégradent le bois traité avec cette toxine – et les produits de dégradation secondaire. Des essais sur le sol ont été mis en place lors de ce stage pour essayer de répondre à ces problématiques.

Ces résultats vont également dans le sens de la réflexion qu'envisage de mener l'ADEME à travers un appel à projet relatif à la dépollution du sol et des bois traités. Le dépôt de projet doit se faire mi-septembre 2013.

REFERENCES

- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D.J., 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403-410.
- Anastasi A., Varese G. C., Bosco F., Chimirri F., Filipello Marchisio V., 2008.** Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. *Bioresource technology*, **99**: 6626-6630.
- Andersson, B. E., Lundstedt, S., Tornberg, K., Schnürer, Y., Öberg, L. G., Mattiasson, B., 2003.** Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood- rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**: 1238-1243.
- Blancaneaux P., 1981.** *Essai sur le milieu naturel de la guyane française*. Paris : Editions de l'O.R.S.T.O.M., 126p. (Travaux et documents de l'O.R.S.T.O.M.).
- Centre d'Excellence de Montréal en Réhabilitation de Site (CEMRS). 2012.** Projets en cours. [On-line]. [01/06/2013].
<URL : file:///F:/Projet_Quebec_page_WEB/Projets%20en%20cours.htm >
- Chaffanel F.. 2011 .** Biodégradation de bois pollués par les communautés fongiques endogènes de sols tropicaux (Guyane). Mémoire de Master 2 (Biologie et Santé). Plouzané : Université de Bretagne Occidentale. 28p.
- Chang Y.-S., 2008.** Recent Developments in Microbial Biotransformation and Biodegradation of Dioxins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **15** :152–171.
- Fougerousse, M., 1979.** Préservation des menuiseries contre la pourriture. *Bois et Forêts des Tropiques*. **183** : 49-66.
- Gold, M. H., Alic, M., 1993.** Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological reviews*, **57** (3) : 605-622.
- Hansen L. D., Nestler C., Ringelberg D., Bajpai R., 2004.** Extended bioremediation of PAH/PCP contaminated soils from the POPILE wood treatment facility. *Chemosphere*, **54**: 1481–1493.
- Hiratsuka N., Oyadomari M., Shinohara H., Tanaka H., Wariishi H., 2005.** Metabolic mechanisms involved in hydroxylation reactions of diphenyl compounds by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, **23**: 241–246.

Ishii K., Furuichi T., Tanikawa N., Kuboshima M., 2009. Estimation of the biodegradation rate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by using dioxin-degrading fungus, *Pseudallescheria boydii*. *Journal of Hazardous Materials*, **162**: 328–332.

Kamei I., Kondo R., 2005. Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**: 560–566.

Kamei I., Takagi K., Kondo R., 2010. Bioconversion of dieldrin by wood-rotting fungi and metabolite detection. *Pest Management Science*, **66**: 888-891.

Lamar R. T., Larsen M. J., and T. Kent Kirk T., 1990. Sensitivity to and Degradation of Pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. *Applied and environmental microbiology*, **56** (11) : 3519-3526.

Lecoeur E., 2012. Caractérisation moléculaire de champignons saprophytes et ectomycorhiziens des maquis miniers de Nouvelle-Calédonie avec une attention spéciale pour le genre *Ganoderma*. Mémoire de Master 1 (Biodiversité Végétale Tropicale). Montpellier : Université Montpellier II. 30p.

Manji S., Ishihara A., 2004. Screening of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-degrading fungi capable of producing extracellular peroxidases under various conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **63**: 438–444.

Mileski G. J., Bumpus J. A., Jurek M. A., Aust S. D., 1988. Biodegradation of Pentachlorophenol by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, **54** (12) : 2885-2889.

Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP). 2011. Lignes directrices relatives à la gestion du bois traité. Québec : Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. Direction des matières résiduelles et des lieux contaminés, 28 pages. ISBN 978-2-550-63493-5.

Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. 2013. [On-line]. [29/05/2013]. <URL : <http://www.developpement-durable.gouv.fr/La-reglementation-biocide.html> >

Mori T., Kondo R., 2002a. Oxidation of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran by white-rot fungus, *Phlebia lindtneri*. *FEMS Microbiology Letters*, **216**: 223-227.

Mori T., Kondo R., 2002b. Oxidation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**: 200–205.

Mullis K. B., Faloona F. A., 1985. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalized chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**:335-350.

Pointing, S. B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57** : 20-33.

Sakaki T., Munetsuna E., 2010. Enzyme systems for biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **88** : 23–30.

Sato A., Watanabe T., Watanabe Y., Kurane R., 2003. Enhancement of biodegradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by addition of fungal culture filtrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**: 439–441.

Schmidt, O., 2006. *Wood and Tree Fungi*. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 334p.

Sierra-Alvarez R., 2007. Fungal bioleaching of metals in preservative-treated wood. *Process Biochemistry*, **42** : 798-804.

Sierra-Alvarez R., 2009. Removal of copper, chromium and arsenic from preservative-treated wood by chemical extraction-fungal bioleaching. *Waste Management*, **29**: 1885–1891.

Suhara H., Kamei I., Maekawa N., Kondo R., 2011. Biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxin by *Coprinellus* species. *Mycoscience*, **52**: 48–52.

Valentín L., Kluczek-Turpeinen B., Oivanen P., Hatakka A., Steffen K., Tuomela M., 2009. Evaluation of basidiomycetous fungi for pretreatment of contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**: 851–858.

Valli K., Wariishi H., Gold M. H., 1992. Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-p-Dioxin by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of bacteriology*, **174** (7): 2131-2137.

Winqvist E., Valentin L., Moilanen U., Leisola M., Hatakka A., Tuomela M., Steffen K. T., 2008. Development of a fungal pre-treatment process for reduction of organic matter in contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**: 845–850.

Zaremski, A., Gastonguay, L., Zaremski, C., Chaffanel, F., Beauchêne, J., Le Floch, G. 2012. Biodegradation of treated wood waste by native fungal communities of tropical soil in French Guiana. *Proceedings IRG Annual Meeting*, (IRG/WP 12-50285): 18 p. International Research Group on Wood Protection Annual Meeting. 43, 2012/05/06-10, Kuala Lumpur, Malaysia.

ANNEXE 1 : PRESENTATION DU LABORATOIRE D'ACCUEIL

Ce stage s'est déroulé dans le Laboratoire des Sciences du Bois de l'UMR ECOFOG (ECologie des Forêts de Guyane). L'UMR ECOFOG est une Unité Mixte de Recherche (UMR) qui regroupe des moyens de AgroParisTech, de l'INRA, du CIRAD, du CNRS et l'Université des Antilles et de la Guyane. ECOFOG fait partie du LabEx CEBA (Centre d'étude de la Biodiversité Amazonienne). Le directeur actuel est Eric Marcon et le directeur adjoint est Marc Gibernau.

L'UMR est composée de quatre équipes :

- Ecologie des Populations, dirigée par Ivan Scotti : description de la distribution actuelle des espèces, des populations et des individus.
- Ecologie des Communautés et des Ecosystèmes, dirigée par Christopher Baraloto : compréhension des facteurs qui amènent à la structure en communautés.
- Matériaux et Molécules, dirigée par Nadine Amusan : étude des relations biotiques et abiotiques au sein de l'écosystème et de l'écosystème avec l'environnement.

Le Laboratoire des Sciences du Bois fait partie de l'équipe Matériaux et Molécules. Le responsable de ce laboratoire est Jacques Beauchêne, qui y est chercheur.

Le stage a été financé par l'équipe Génétique et amélioration des espèces pérennes : modèles Forêt et Palmier, dirigée par Jean-Marc Bouvet, dans laquelle Alba Zaremski est chercheur, qui fait partie de l'UMR AGAP (Amélioration Génétique et Adaptations des Plantes méditerranéenne et tropicale). L'UMR AGAP est une Unité Mixte de Recherche (UMR) qui regroupe des moyens du CIRAD, de l'INRA et de SupAgro. Le directeur est Jean-Christophe Glaszmann et les directeurs adjoints sont Robert Domaingue, Emmanuel Guiderdoni, Sylvie Lewicki Dhainaut et Patrice This.

L'UMR AGAP est composée de 13 équipes : Amélioration des Plantes à Multiplication Végétative, Architecture et Fonctionnement des Espèces Fruitières, Biologie cellulaire de la réponse au stress abiotiques et biotiques chez les espèces pérennes, Développement Adaptatif du Riz, Diversité et Adaptation de la Vigne et des Espèces Méditerranéennes, Evaluation, Gestion et Valorisation des ressources génétiques, Génétique et amélioration des espèces pérennes : modèles Forêt et Palmier, Génétique et Innovation Variétale, Génome et Sélection, Intégration de Données, Plasticité phénotypique et Adaptation des Monocotylédones, Structure et Evolution des Génomes, Virtual Plants.

**ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'EXTRACTION INVITROGEN PURELINK
TOTAL DNA PURIFICATION KIT, AVEC LES OPTIMISATIONS DE LECOEUR
(2012) POUR L'EXTRACTION D'ADN FONGIQUE DANS LE BOIS, SOULIGNEES.**

1. Freeze the tissue in liquid nitrogen and grind the tissue to a powder.
2. Add 250 µl (500 µl) Resuspension Buffer (R2) supplied in the kit to the tissue from Step 1 at room temperature.
3. Prepare lysate by homogenizing the soft tissue with a tissue homogenizer or vortexing the ground tissue/lyophilized sample until sample is completely resuspended.
4. Add 15 µl (30 µl) 20% SDS and 15 µl (30 µl) RNase A (20 mg/ml) supplied in the kit to the lysate.
5. Incubate the lysate at 55°C for 15 minutes to complete lysis.
6. Centrifuge the lysate at high speed for 5 minutes to remove insoluble materials.
7. Transfer the clear supernatant to a sterile, 1.5 ml microcentrifuge tube without disturbing the pellet.
8. Add 100 µl (200 µl) Precipitation Buffer (N2) supplied with the kit to the clear lysate. Mix by vortexing and incubate **on ice** for 5 minutes.

The proteins and polysaccharides are precipitated and any photosynthetic pigments that are bound to proteins are also removed with this step. The pigments can stain the PureLink™ spin cartridge material that may produce colored eluate.

9. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes at room temperature to produce a clear lysate. **Note:** The supernatant should be clear and not viscous after this precipitation step.
10. Transfer 250 µl clear lysate to a new, sterile microcentrifuge tube and add 375 µl Binding Buffer (B4) with ethanol (previous page) to the lysate. Mix well.

Binding DNA:

1. Remove a PureLink™ Spin Cartridge in a Collection Tube from the package.
2. Add sample with Binding Buffer from Step 10, previous page to the PureLink™ Spin Cartridge.
3. Centrifuge the cartridge at 10,000 × g for 30 seconds at room temperature.
4. Discard the flow through and place the spin cartridge into the Wash Tube supplied with the kit.

Washing DNA:

1. Add 500 µl Wash Buffer (W4) supplied in the kit to the cartridge.
2. Centrifuge the cartridge at $10,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through from the Wash Tube and place the column back into the tube.
3. Add 500 µl Wash Buffer (W5) with ethanol (page 5) to the column.
4. Centrifuge the cartridge at $10,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through from the Wash Tube and place the cartridge back into the tube.
5. **Repeat** Steps 3-4 one more time.
6. Centrifuge the cartridge at maximum speed for 2 minutes at room temperature to remove any residual Wash Buffer (W5). Discard the Wash Tube.

Eluting DNA:

1. Place the spin cartridge in a sterile, DNase-free 1.5-ml microcentrifuge tube.
2. Add 100 µl (50 µl) of distilled water (pH >7.0).
3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the cartridge at maximum speed for 1 minute.

The elution tube contains the purified DNA.

Storing DNA:

Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application.

For long-term storage, store the purified DNA in Elution Buffer (E1) at -20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at -20°C for long-term storage.

ANNEXE 3 : COMPLEMENTS AU MATERIEL ET METHODES

1. *Polymérase Chain Reaction (PCR)*

La réaction de PCR nécessite que l'ADN soit mis en présence des éléments suivants :

- des amorces : ITS1-myc 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGC 3' et ITS4-myc 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'. ITS1-myc (forward) et ITS4-myc (reverse) sont les amorces spécifiques des champignons supérieurs. Ainsi, seul l'ADN des champignons est amplifié, l'ADN bactérien ne l'étant pas. Ces amorces amplifient la région de l'opéron ribosomale de l'ADN nucléaire qui comprend le gène codant pour la sous unité ribosomale 5,8S. Cette région est très conservée, ce qui permet une étude interspécifique. Les ITS1 et ITS4 sont préparés en mélangeant respectivement 20 µL d'ITS1 avec 80 µL d'eau Millipore stérile et 20 µL d'ITS4 avec 80 µL d'eau Millipore stérile.
- des désoxyribonucléotides qui permettent la synthèse du brin complémentaire.
La dNTP est préparée en mélangeant 10 µL de chaque (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), avec 360 µL d'eau Millipore stérile.
- de la Taq polymérase, ADN polymérase, utilisée pour dupliquer l'ADN. Dans la réaction de PCR, elle reste active à très haute température, indispensable à la réalisation de la PCR mais peu stable, elle est introduite en avant dernier dans le milieu réactionnel.
- MgCl₂, nécessaire pour activer la Taq polymérase.

Tous les réactifs, **sauf l'ADN total extrait**, sont homogénéisés avant introduction, afin d'homogénéiser l'ensemble. Dès que le mélange a été réalisé, la réaction de polymérisation peut débuter. Pour cela, on utilise un thermocycleur Eppendorf® Master cycler qui permet la mise en œuvre de différents temps d'incubation à différentes températures, suivant un cycle prédéfini. Ce cycle comporte les trois étapes citées précédemment dont les propriétés sont les suivantes :

- la dénaturation : elle se fait à une température de 95°C. La chaleur permet la rupture des liaisons entre les deux brins d'ADN et leur séparation. Pour qu'il y ait dénaturation, la température doit être supérieure à la température de fusion T_m.
- l'hybridation : pour cette étape, la température doit être inférieure de 5 à 10°C à la température de fusion. La température de fusion est donnée par la formule : $T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$ d'où T_m (ITS1-myc) = 62°C et T_m (ITS4-myc) = 58°C. La température d'hybridation sera alors de 55°C

- L'élongation : lors de cette dernière étape, la Taq polymérase réplique le brin complémentaire de celui sur lequel elle est fixée. La température optimale de fonctionnement de cette polymérase est de 72°C. Pour obtenir une quantité d'ADN suffisamment importante, 30 cycles sont répétés.

2. *Electrophorèse*

Le gel est réalisé dans un erlenmeyer en pesant 0.45g d'agarose et en ajoutant 30 mL de TAE 0.5 X (Tris/Acétate/EDTA), préparé par dilution à partir de TAE 50X (100 mL pour QSP 5,0L). Le TAE possède le plus faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille que le TBE (Tris/Borate/EDTA). La dissolution de l'agarose dans le TAE est une dissolution douce effectuée à la micro-onde en environ 1 minute, en agitant de temps en temps pour homogénéiser le mélange. Durant cette cuisson, l'erlenmeyer est en partie obturé pour limiter l'évaporation.

Le gel est ensuite coulé dans la cuve de 400 mL contenant un support permettant de le retirer, et dans laquelle est placé le peigne de 17 ou 25 puits. Le gel durcit pendant 1 heure. Une plaque de puits est utilisée pour préparer le mélange destiné à l'électrophorèse. 2 µL de Bleu de charge est placé dans chaque puits et 5 µL de produits PCR (ADN amplifié) est ajouté (1 échantillon par puits).

Le bleu de charge est du Bleu de bromophénol (BBP), ou tétrabromophénolsulfonephthaléine. C'est un indicateur coloré, bleu à pH>4,6 qui permet de vérifier le bon déroulement de l'électrophorèse en gel d'agarose. Il est légèrement chargé négativement et migre ainsi dans la même direction que l'ADN. La distance de migration varie en fonction de la densité du gel et de la composition du tampon, mais dans les conditions typiques d'utilisation (gel d'agarose à 1 à 1,5% dans un tampon TAE ou TBE), le bleu de bromophénol migre à la même distance qu'un fragment d'ADN d'environ 500 paires de bases. Chaque gel doit avoir au moins une échelle de poids moléculaire (marqueurs de taille). Ici, deux marqueurs de taille sont placés chacun à une extrémité du gel. Les deux puits les plus extérieurs du gel ne sont pas utilisés.

Les marqueurs de taille contiennent déjà du bleu de charge pour la détermination de la taille d'un fragment de 50 à 1031 paires de bases et le Gene ruler ladder mix, pour celle des fragments compris entre 100 et 10000 paires de bases. L'ADN des champignons supérieurs est généralement compris entre 600 et 700 paires de bases.

Le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant environ 400 mL de tampon TAE 0.5X. Le tampon est versé avec précaution afin de ne pas déloger les solutions d'ADN extraits des puits. La migration s'effectue à une tension de 75 Volts pendant environ 45 minutes. La révélation s'effectue dans une salle réservée à l'utilisation du BET pour les gels. Aucun matériel, excepté les portoirs des gels, ne sort de cette pièce. Le gel est plongé dans un bain de BET quelques minutes, puis rincé brièvement dans un premier bain d'eau distillée. Il repose ensuite 10 minutes dans un second bain d'eau distillée afin d'éliminer le surplus de BET. Le gel est ensuite révélé aux UV. Les bandes révélées, bandes positives, sont découpées pour être purifiées. Le BET est un agent intercalant de l'ADN qui devient fluorescent lorsqu'il est éclairé avec des rayons ultraviolets (UV). Avec un transilluminateur on peut alors voir les bandes de migration sur le gel. Une photographie du gel est prise grâce au logiciel UVP.

3. Séquençage

Lorsqu'un ddNTP est incorporé dans une séquence, aucun nucléotide ne peut être rattaché à celle-ci. Un ddNTP ne possédant pas de groupement – OH, les nucléotides ne peuvent pas s'attacher à leur suite lors de l'élongation. Lorsque les ddNTP sont en faible concentration, leur insertion dans une séquence est totalement aléatoire. En renouvelant plusieurs fois la réplication, on peut alors obtenir des séquences de longueurs différentes, se terminant toutes par un ddNTP du même type. La reconstitution d'une séquence d'ADN s'effectue par électrophorèse de fragments de différentes tailles.

4. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

En février 2004, plus de trente-deux millions de séquences (32549400) étaient disponibles dans les bases de données de NCBI. Ce nombre s'accroît notamment avec le développement des programmes de comparaison de séquences. Les programmes de comparaison de séquences ont pour objectif de repérer les régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique, de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue.

BLAST utilise les matrices de comparaison entre acides nucléiques ou protéines pour évaluer la pertinence de ces alignements et calcule un score de « vraisemblance » à l'alignement obtenu. Le score de « vraisemblance » qualifie et quantifie la similitude entre les séquences. Celui-ci peut mesurer soit le rapprochement, soit l'éloignement des séquences pour refléter ce qui les sépare. Ce critère qui permet déjà d'établir des ressemblances ne suffit pas

toujours pour révéler au mieux les similitudes entre séquences. Très rapidement, on s'est aperçu qu'une insertion ou une délétion d'une ou plusieurs bases pouvait améliorer le score d'une comparaison et ainsi faire davantage ressortir les zones identiques ou très proches. Ces brèches (en anglais gap) que l'on impose aux séquences sont évidemment pénalisantes dans le calcul du score.

Les critères de ressemblance

À un alignement donné est toujours associé un score. Les programmes d'alignement, quels qu'ils soient, cherchent toujours à maximiser ce score. Nous pouvons penser que plus le score est grand, plus l'alignement est significatif. Ce raisonnement est valide si l'on s'intéresse à une famille homogène où toutes les séquences ont à peu près la même longueur : dans ce cas plus le score est élevé, plus la ressemblance est grande, ce qui ne nous dit pas cependant si elle est significative (Risler et al. 2003). Dans notre étude, plutôt que d'utiliser les scores nous allons utiliser les pourcentages d'identités ou de similarités entre deux séquences et nos critères de vraisemblance seront les suivants : 1) $\geq 80\%$ de similarité ; 2) Fasse partie du règne fongique ; 3) Comprenne les régions ITS1, 5.8S et ITS4.

RESUME

La dégradation de différentes toxines par les microorganismes a été étudiée par divers auteurs. Alors que leur dégradation par les bactéries ou les cortèges de microorganismes l'est tout autant, la focalisation sur les champignons l'est moins. Il en ressort, néanmoins, que les champignons mis en évidence dans ces dégradations sont souvent des champignons lignicoles, notamment grâce à la Lignine Peroxydase, la Manganèse Peroxydase et le Cytochrome P-450. Ici, l'étude se focalise sur ces champignons lignicoles issus de sols forestiers tropicaux de la Guyane et de La Réunion en étudiant, notamment, par la mesure des pertes de masse d'éprouvettes de bois traitées (*Pinus resinosa* Kral) ou non (*Simarouba amara* Aubl.), leur capacité de dégradation des toxines. Il a ainsi pu être montré que la dégradation dépend du type de sol, à petite et à grande échelle, et aussi du type de traitement. L'étude vise également à déterminer des espèces de champignons capables de dégrader les deux traitements chimiques de nos éprouvettes : le Pentachlorophénol (PCP) et l'Arséniate de Cuivre Chromaté (CCA).

MOTS CLES

Arséniate de Cuivre Chromaté (CCA), Bois traités, Champignons lignicoles, Dégradation, PentaChloroPhénol (PCP), Perte de masse, Sol tropical.

ABSTRACT

Degradation of different toxins by microorganisms has been studied by many authors. Whereas this degradation by bacteria or microorganisms cortege is well considered, focus on fungi is scarce. But, studies on fungi reveal that these ones are lignicolus ones. They can degrade toxins with Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase and Cytochrome P-450. The following study focus on these tropical soils of French Guyana and Reunion lignicolus fungi toxins degradation capacity, by treated wood cores (*Pinus resinosa* Kral) and non treated ones (*Simarouba amara* Aubl.) weight loss measurement. Then, it has been demonstrated that degradation depends on soil kind, at small and large scale, and on treatment kind. The aim of the study is also the determination of fungi species able to degrade both treatments of or wood cores : Pentachlorophenol (PCP) and Chromated Copper Arsenate (CCA).

KEY WORDS

Chromated Copper Arsenate (CCA), Degradation, Lignicolus fungi, Pentachlorophenol (PCP), Treated wood, Tropical soil, Weight loss.